

18.10.2004

10/576354

GR04/00051 PCT/GA 2004/000051

ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ (ΟΒΙ)

REC'D 22 DEC 2004

WIPO

PCT

**ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΤΙΚΟ**

Βεβαιώνουμε ότι τα έγγραφα που συνοδεύουν το πιστοποιητικό αυτό, είναι ακριβή και πιστά αντίγραφα της κανονικής αίτησης για Δίπλωμα Ευρεσιτεχνίας, με αριθμό 20030100421, που κατατέθηκε στον Οργανισμό Βιομηχανικής Ιδιοκτησίας στις 16/10/2003, από τον κ. Οικονομόπουλο Ιωάννη, που κατοικεί στην οδό Θρασυβούλου 4 στο Χαλάνδρι.

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Μαρούσι, 14/12/2004

Για τον Ο.Β.Ι.  
Ο Γενικός Διευθυντής

Εμμανουήλ Σαμουηλίδης

ΠΑΝΤΑΝΑΣΣΗΣ 5, 151 25 ΠΑΡΑΛΙΣΣΟΣ ΑΜΑΡΟΥΣΙΟΥ - ΤΗΛ.: 210 61-83-533 - FAX: 210 68 19 231



ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ  
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ  
ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ

# ΑΙΤΗΣΗ ΓΙΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ (ΔΕ)

Ή

ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ (ΔΤ)

Ή

ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΥΠΟΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ (ΠΥΧ)

1004624/6-7-04

συμπληρώνεται  
από τον ΟΒΙ

|                       |              |    |
|-----------------------|--------------|----|
| Αριθμός αίτησης:      | 20030100421  | 01 |
| Ημερομηνία παραλαβής: | 16 ΟΚΤ. 2003 |    |
| Ημερομηνία κατάθεσης: | 16 ΟΚΤ. 2003 |    |

Με την αίτηση αυτή ζητείται:

|   |  |    |
|---|--|----|
| X | ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ (Δ.Ε.)                     | 02 |
|   | ΔΙΠΛΩΜΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ (Δ.Τ.) ΣΤΟ Δ.Ε. με αριθμό:  |    |
|   | ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΥΠΟΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ (Π.Υ.Χ.) |    |

Η αίτηση αυτή είναι τμηματική της αίτησης με αριθμό:

03

ΤΙΤΛΟΣ ΤΗΣ ΕΦΕΥΡΕΣΗΣ:

04

ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ *MYCOBACTERIUM AVIUM*  
subs. *PARATUBERCULOSIS*

ΚΑΤΑΘΕΤΗΣ

05

όνομα ή επωνυμία: Ιωάννης Οικονομόπουλος

διεύθυνση ή έδρα: Θρασυβούλου 44, Χαλάνδρι 152 34

εθνικότητα:

τηλέφωνο:

τέλεξ:

τέλεφαξ:

ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΚΑΤΑΘΕΤΕΣ ΣΕ ΠΡΟΣΘΕΤΟ ΦΥΛΛΟ ΧΑΡΤΙΟΥ

06

αριθμός

## ΕΦΕΥΡΕΤΗΣ

07

Ο(ι) καταθέτης(ες) είναι ο(οι) μοναδικός(οί) εφευρέτης(ες).

X

Έντυπο ορισμού του(των) εφευρέτη(ών) επισυνάπτεται.

## ΑΞΙΩΣΕΙΣ

08

Αριθμός αξιώσεων:

9

## ΔΗΛΩΣΗ ΠΡΟΤΕΡΑΙΟΤΗΤΑΣ

(αριθμός - ημερομηνία - χώρα προέλευσης)

09

## ΠΛΗΡΕΞΟΥΣΙΟΣ

10

όνομα: Άλκηστις-Ειρήνη Μαλάμη  
 διεύθυνση: Σκουφά 52, 106 72 Αθήνα  
 τηλέφωνο: 210-3629855

τέλεξ:

τέλεφαξ: 210-3647994

## ΑΝΤΙΚΛΗΤΟΣ

11

όνομα: Άλκηστις-Ειρήνη Μαλάμη  
 διεύθυνση: Σκουφά 52, 106 72 Αθήνα  
 τηλέφωνο: 210-3629855

τέλεξ:

τέλεφαξ: 210-3647994

## ΔΙΕΘΝΗΣ ΕΚΘΕΣΗ

12

Η εφεύρεση παρουσιάστηκε σε επίσημα αναγνωρισμένη έκθεση, σύμφωνα με το ν. 5562/1932,  
 ΦΕΚ 221Α/32.  
 Σχετική βεβαίωση επισυνάπτεται.

## ΥΠΟΓΡΑΦΗ(ΕΣ) ΤΟΥ(ΤΩΝ) ΚΑΤΑΘΕΤΗ(ΩΝ) ή ΤΟΥ(ΤΩΝ) ΠΛΗΡΕΞΟΥΣΙΟΥ(ΩΝ).

13

Τόπος: Αθήνα

Ημερομηνία 15/10/2003

ΑΛΚΗΣΤΙΣ - ΕΙΡΗΝΗ Α. ΜΑΛΑΜΗ  
 Δ Ι Κ Η Γ Ρ Ο Σ  
 ΣΚΟΥΦΑ 52, 106 72 ΑΘΗΝΑ  
 ΤΗΛ. 3629855 FAX 3647994

ΠΑΡΑΚΑΛΟΥΜΕ Η ΑΙΤΗΣΗ ΝΑ ΕΙΝΑΙ ΔΑΚΤΥΛΟΓΡΑΦΗΜΕΝΗ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΟ ΟΝΟΜΑ ΚΑΤΩ ΑΠΟ ΤΗΝ ΥΠΟΓΡΑΦΗ.  
 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΝΟΜΙΚΟΥ ΠΡΟΣΩΠΟΥ ΝΑ ΔΑΚΤΥΛΟΓΡΑΦΗΘΕΙ ΚΑΙ Η ΙΔΙΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΥΠΟΓΡΑΦΟΝΤΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ  
 ΕΤΑΙΡΕΙΑ.



ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ  
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ  
ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ

## ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΦΕΥΡΕΤΗ<sup>23</sup>

(Συμπληρώνεται στην περίπτωση που ο καταθέτης είναι νομικό πρόσωπο,  
ή ο καταθέτης δεν είναι και εφευρέτης, ή ο μόνος εφευρέτης)

E

|                       |              |    |
|-----------------------|--------------|----|
| Αριθμός αίτησης:      | 20030100421  | 24 |
| Ημερομηνία κατάθεσης: | 16 ΟΚΤ. 2003 |    |

Αίτηση για:

|   |  |    |
|---|--|----|
| X | ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ (Δ.Ε.)                     | 25 |
|   | ΔΙΠΛΩΜΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ (Δ.Τ.) ΣΤΟ Δ.Ε. με αριθμό:  |    |
|   | ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΥΠΟΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ (Π.Υ.Χ.) |    |

Δηλώνω(ουμε) ως εφευρέτη(ες) στην παραπάνω αίτηση για χορήγηση Ελληνικού τίτλου προστασίας τον(τους):

|   |   |    |
|---|---|----|
| ΕΦΕΥΡΕΤΗΣ (όνομα/διεύθυνση):  |   | 26 |
| Ιωάννης Οικονομόπουλος<br>Θρασυβούλου 44<br>Χαλάνδρι 152 34             |   |    |
| Ο καταθέτης απέκτησε το δικαίωμα κατάθεσης Ελληνικού τίτλου προστασίας: |   |    |
| <input checked="" type="checkbox"/>                                     | Λόγω σύμβασης μεταβίβασης δικαιωμάτων από: ..... / ..... / .....                  |    |
| <input type="checkbox"/>  | Λόγω κληρονομικής διαδοχής.   |    |
| <input type="checkbox"/>  | Λόγω συμβατικής σχέσης εργοδότη - εργαζόμενου (υπηρεσιακή ή εξαρτημένη εφεύρεση). |    |
| <input type="checkbox"/>  | Με βάση το καταστατικό της εταιρείας.   |    |
| 4   | ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΕΦΕΥΡΕΤΕΣ ΣΕ ΠΡΟΣΘΕΤΟ ΦΥΛΛΟ ΧΑΡΤΙΟΥ.                                     | 27 |

αριθμός

|  |   |                        |
|--|---|------------------------|
| ΥΠΟΓΡΑΦΗ(ΕΣ) ΤΟΥ(ΤΩΝ) ΚΑΤΑΘΕΤΗ(ΩΝ) ή ΤΟΥ(ΤΩΝ) ΠΛΗΡΕΞΟΥΣΙΟΥ(ΩΝ) |   | 28                     |
| Τόπος: Αθήνα   | ΑΛΚΗΣΤΙΣ - ΕΙΡΗΝΗ Α. ΜΑΛΑΜΗ<br>ΔΙΚΗΓΟΡΟΣ<br>ΣΚΟΥΦΑ 52 ΧΑΛΑΝΔΡΙ ΑΘΗΝΑ<br>Τ.ΗΛ. 3629955 FAX 3647994 | Ημερομηνία: 15/10/2003 |



ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ  
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ  
ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ

# ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΦΕΥΡΕΤΗ<sup>23</sup>

(Συμπληρώνεται στην περίπτωση που ο καταθέτης είναι νομικό πρόσωπο,  
ή ο καταθέτης δεν είναι και εφευρέτης, ή ο μόνος εφευρέτης)

E

Αριθμός αίτησης:

20030100421

24

Ημερομηνία κατάθεσης:

16 ΟΚΤ. 2003

Αίτηση για:

|   |  |
|---|--|
| X | ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ (Δ.Ε.)                     |
|   | ΔΙΠΛΩΜΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ (Δ.Τ.) ΣΤΟ Δ.Ε. με αριθμό:  |
|   | ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΥΠΟΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ (Π.Υ.Χ.) |

25

Δηλώνω(ουμε) ως εφευρέτη(ες) στην παραπάνω αίτηση για χορήγηση Ελληνικού τίτλου προστασίας τον(τους):

ΕΦΕΥΡΕΤΗΣ (όνομα/διεύθυνση):

26

Βασίλης Γοργούλης

Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών  
Τμήμα Ιατρικής Σχολής  
Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας  
Μικράς Ασίας 75, Γουδί, Αθήνα

Ο καταθέτης απέκτησε το δικαίωμα κατάθεσης Ελληνικού τίτλου προστασίας:

|   |
|---|
| X |
|   |
|   |
|   |
|   |

Λόγω σύμβασης μεταβίβασης δικαιωμάτων από: ..... / ..... / .....

Λόγω κληρονομικής διαδοχής.

Λόγω συμβατικής σχέσης εργοδότη - εργαζόμενου (υπηρεσιακή ή εξαρτημένη εφεύρεση).

Με βάση το καταστατικό της εταιρείας.

3

ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΕΦΕΥΡΕΤΕΣ ΣΕ ΠΡΟΣΘΕΤΟ ΦΥΛΛΟ ΧΑΡΤΙΟΥ.

27

αριθμός

ΥΠΟΓΡΑΦΗ(ΕΣ) ΤΟΥ(ΤΩΝ) ΚΑΤΑΘΕΤΗ(ΩΝ) ή ΤΟΥ(ΤΩΝ) ΠΛΗΡΕΞΟΥΣΙΟΥ(ΩΝ)

28

Τόπος: Αθήνα

Ημερομηνία: 15/10/2003

ΑΛΚΗΣΤΙΣ - ΕΙΡΗΝΗ Α. ΙΜΑΔΑΜΗ  
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ  
ΣΚΟΥΦΑΣ 52 106 72 ΑΘΗΝΑ  
ΤΗΛ. 3629855 FAX 3647994



ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ  
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ  
ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ

## ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΦΕΥΡΕΤΗ<sup>23</sup>

(Συμπληρώνεται στην περίπτωση που ο καταθέτης είναι νομικό πρόσωπο,  
ή ο καταθέτης δεν είναι και εφευρέτης, ή ο μόνος εφευρέτης)

E

|                       |              |    |
|-----------------------|--------------|----|
| Αριθμός αίτησης:      | 20030100421  | 24 |
| Ημερομηνία κατάθεσης: | 16 ΟΚΤ. 2003 |    |

Αίτηση για:

|                                     |  |    |
|-------------------------------------|--|----|
| <input checked="" type="checkbox"/> | ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ (Δ.Ε.)                     | 25 |
| <input type="checkbox"/>            | ΔΙΠΛΩΜΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ (Δ.Τ.) ΣΤΟ Δ.Ε. με αριθμό:  |    |
| <input type="checkbox"/>            | ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΥΠΟΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ (Π.Υ.Χ.) |    |

Δηλώνω(ουμε) ως εφευρέτη(ες) στην παραπάνω αίτηση για χορήγηση Ελληνικού τίτλου προστασίας τον(τους):

|  |   |    |
|--|---|----|
| ΕΦΕΥΡΕΤΗΣ (όνομα/διεύθυνση):   |   | 26 |
| Μαρία Γαζούλη<br>Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών<br>Τμήμα Ιατρικής Σχολής<br>Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας<br>Μικράς Ασίας 75, Γουδί, Αθήνα 11527 |   |    |
| Ο καταθέτης απέκτησε το δικαίωμα κατάθεσης Ελληνικού τίτλου προστασίας:  |   |    |
| <input checked="" type="checkbox"/>  | Λόγω σύμβασης μεταβίβασης δικαιωμάτων από: ..... / ..... / .....                  |    |
| <input type="checkbox"/>   | Λόγω κληρονομικής διαδοχής.   |    |
| <input type="checkbox"/>   | Λόγω συμβατικής σχέσης εργοδότη - εργαζόμενου (υπηρεσιακή ή εξαρτημένη εφεύρεση). |    |
| <input type="checkbox"/>   | Με βάση το καταστατικό της εταιρείας.   |    |
| 2  | ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΕΦΕΥΡΕΤΕΣ ΣΕ ΠΡΟΣΘΕΤΟ ΦΥΛΛΟ ΧΑΡΤΙΟΥ.                                     | 27 |

αριθμός

|  |  |                        |
|--|--|------------------------|
| ΥΠΟΓΡΑΦΗ(ΕΣ) ΤΟΥ(ΤΩΝ) ΚΑΤΑΘΕΤΗ(ΩΝ) ή ΤΟΥ(ΤΩΝ) ΠΛΗΡΕΞΟΥΣΙΟΥ(ΩΝ) |  | 28                     |
| Τόπος: Αθήνα   | ΑΛΚΗΣΤΙΣ - ΕΙΡΗΝΗ Α. ΜΑΛΑΜΗ<br>ΔΙΚΗΤΩΡΟΣ<br>ΣΚΟΥΦΑ 52, 105 72, ΑΘΗΝΑ<br>ΤΗΛ. 3629365 FAX 3647994 | Ημερομηνία: 15/10/2003 |



ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ  
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ  
ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ

## ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΦΕΥΡΕΤΗ<sup>23</sup>

(Συμπληρώνεται στην περίπτωση που ο καταθέτης είναι νομικό πρόσωπο,  
ή ο καταθέτης δεν είναι και εφευρέτης, ή ο μόνος εφευρέτης)

E

|                       |              |    |
|-----------------------|--------------|----|
| Αριθμός αίτησης:      | 20030100421  | 24 |
| Ημερομηνία κατάθεσης: | 16 ΟΚΤ. 2003 |    |

Αίτηση για:

|   |  |    |
|---|--|----|
| X | ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ (Δ.Ε.)                     | 25 |
|   | ΔΙΠΛΩΜΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ (Δ.Τ.) ΣΤΟ Δ.Ε. με αριθμό:  |    |
|   | ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΥΠΟΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ (Π.Υ.Χ.) |    |

Δηλώνω(ουμε) ως εφευρέτη(ες) στην παραπάνω αίτηση για χορήγηση Ελληνικού τίτλου προστασίας τον(τους):

ΕΦΕΥΡΕΤΗΣ (όνομα/διεύθυνση):

Ivo Pavlik

Veterinary Research Institute  
Mycobacteriology Unit

Βρηο

Δημοκρατία της Τσεχίας

Ο καταθέτης απέκτησε το δικαίωμα κατάθεσης Ελληνικού τίτλου προστασίας:

|   |
|---|
| X |
|   |
|   |
|   |
|   |

Λόγω σύμβασης μεταβίβασης δικαιωμάτων από: ..... / ..... / .....

Λόγω κληρονομικής διαδοχής.

Λόγω συμβατικής σχέσης εργοδότη - εργαζόμενου (υπηρεσιακή ή εξαρτημένη εφεύρεση).

Με βάση το καταστατικό της εταιρείας.

|   |   |    |
|---|---|----|
| 1 | ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΕΦΕΥΡΕΤΕΣ ΣΕ ΠΡΟΣΘΕΤΟ ΦΥΛΛΟ ΧΑΡΤΙΟΥ. | 27 |
|---|---|----|

αριθμός

ΥΠΟΓΡΑΦΗ(ΕΣ) ΤΟΥ(ΤΩΝ) ΚΑΤΑΘΕΤΗ(ΩΝ) ή ΤΟΥ(ΤΩΝ) ΠΛΗΡΕΞΟΥΣΙΟΥ(ΩΝ)

Τόπος: Αθήνα

Ημερομηνία: 15/10/2003

ΑΛΚΗΣΤΙΣ - ΕΙΡΗΝΗ Α. ΜΑΛΛΑΜΗ  
ΔΙΚΗΤΟΡΟΣ  
ΣΚΟΥΦΑ 52, 10672 ΑΘΗΝΑ  
ΤΗΛ. 3629996 FAX 3647994



ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ  
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ  
ΙΔΙΟΚΤΗΣΙΑΣ

# ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΦΕΥΡΕΤΗ<sup>23</sup>

(Συμπληρώνεται στην περίπτωση που ο καταθέτης είναι νομικό πρόσωπο,  
ή ο καταθέτης δεν είναι και εφευρέτης, ή ο μόνος εφευρέτης)

E

|                       |              |    |
|-----------------------|--------------|----|
| Αριθμός αίτησης:      | 20030100421  | 24 |
| Ημερομηνία κατάθεσης: | 16 Οκτ. 2003 |    |

Αίτηση για:

|                                     |  |    |
|-------------------------------------|--|----|
| <input checked="" type="checkbox"/> | ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΥΡΕΣΙΤΕΧΝΙΑΣ (Δ.Ε.)                     | 25 |
| <input type="checkbox"/>            | ΔΙΠΛΩΜΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ (Δ.Τ.) ΣΤΟ Δ.Ε. με αριθμό:  |    |
| <input type="checkbox"/>            | ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΥΠΟΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑΣ (Π.Υ.Χ.) |    |

Δηλώνω(ουμε) ως εφευρέτη(ες) στην παραπάνω αίτηση για χορήγηση Ελληνικού τίτλου προστασίας τον(τους):

ΕΦΕΥΡΕΤΗΣ (όνομα/διεύθυνση):

Milan Bartos

Veterinary Research Institute  
Mycobacteriology Unit  
Brno  
Δημοκρατία της Τσεχίας

Ο καταθέτης απέκτησε το δικαίωμα κατάθεσης Ελληνικού τίτλου προστασίας:

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Λόγω σύμβασης μεταβίβασης δικαιωμάτων από: ..... / ..... / .....                  |
| <input type="checkbox"/>            | Λόγω κληρονομικής διαδοχής.   |
| <input type="checkbox"/>            | Λόγω συμβατικής σχέσης εργοδότη - εργαζόμενου (υπηρεσιακή ή εξαρτημένη εφεύρεση). |
| <input type="checkbox"/>            | Με βάση το καταστατικό της εταιρείας.   |
| <input type="checkbox"/>            | .....   |

ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΕΦΕΥΡΕΤΕΣ ΣΕ ΠΡΟΣΘΕΤΟ ΦΥΛΛΟ ΧΑΡΤΙΟΥ.

αριθμός

ΥΠΟΓΡΑΦΗ(ΕΣ) ΤΟΥ(ΤΩΝ) ΚΑΤΑΘΕΤΗ(ΩΝ) ή ΤΟΥ(ΤΩΝ) ΠΛΗΡΕΞΟΥΣΙΟΥ(ΩΝ)

Τόπος: Αθήνα

Ημερομηνία: 15/10/2003

ΑΛΚΗΣΤΙΣ - ΕΙΡΗΝΗ / Α. ΜΑΛΑΜΗ  
ΔΙΚΗΤΟΡΟΣ  
ΣΚΟΥΦΑ 52 / 105, 12 / ΑΘΗΝΑ  
ΤΗΛ. 3629955 FAX 3647994



**ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ *MYCOBACTERIUM AVIUM*  
subsp. *PARATUBERCULOSIS***

**Πεδίο της εφεύρεσης**

5 Η παρούσα εφεύρεση αφορά σε μοριακή μέθοδο ταυτοποίησης του *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Ειδικότερα, αφορά σε αντιδράσεις PCR με ζεύγη ολιγονουκλεϊτιδίων εκκινητών που στοχεύουν σε διαφορετικές γενομικές περιοχές του εξειδικευμένου για το MAP στοιχείου IS900, για χρήση στην μοριακή ανίχνευση και ταυτοποίηση του MAP.

10

**Προηγούμενη στάθμη της τεχνικής**

Το *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) είναι ένα ιδιαίτερα απαιτητικό, από άποψης μικροβιολογικής ταυτοποίησης, βακτήριο που μπορεί να προσβάλλει διάφορα ζωικά είδη, προκαλώντας σε ορισμένα από αυτά βαριάς μορφής και  
15 συχνά θανατηφόρου απόληξης νόσο (συγκεκριμένα παραφυματίωση). Άλλωστε τελευταία γίνονται όλο και συχνότερα αναφορές που σχετίζουν το συγκεκριμένο βακτήριο MAP με ορισμένες διαδεδομένες φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου του ανθρώπου (Chiodini, 1989), (Chamberlin et al., 2001).

Σήμερα, η ταυτοποίηση του MAP διευκολύνεται από την ευρεία εφαρμογή  
20 μοριακών τεχνικών. Όμως η ανάγκη επαλήθευσης των αποτελεσμάτων καθιστά τις υπάρχουσες τεχνικές να απαιτούν πολλή εργασία και πρακτικά να έχουν εφαρμογή μόνο για ερευνητικούς σκοπούς.

Ειδικότερα, η διάγνωση προσβολών από το MAP με ορολογικές εξετάσεις απαιτεί περαιτέρω επαλήθευση για να αποφευχθούν εσφαλμένα αρνητικά αποτελέσματα, το οποία  
25 παρατηρούνται συχνά σε αρχικά στάδια μόλυνσεως, καθώς και διασταυρωμένες αντιδράσεις με διαδεδομένα στη φύση, γενετικά συγγενή, μυκοβακτηριακά είδη (Ridge κ.α. 1991, Nielsen κ.α. 2001). Η χρησιμότητα της καλλιέργειας, ως μεθόδου διάγνωσης ή επιβεβαίωσης έχει ως εμπόδιο την μακρό χρονικό διάστημα επώασης που απαιτείται για την ανάπτυξη του MAP.

30 Έτσι, η Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR) θεωρείται από καιρό ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση του ανωτέρω βακτηρίου (Hance et al., 1989). Όμως η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων είναι απαραίτητη και για τις μοριακές μεθόδους, ιδιαίτερα όταν εφαρμόζονται για διάγνωση ρουτίνας. Αυτό συνήθως απαιτεί την ενσωμάτωση αντιδράσεων υβριδισμού, γεγονός που καθιστά την όλη  
35 διαδικασία να απαιτεί πολλή δουλειά και χρήσιμη μόνο για ερευνητικούς σκοπούς.

P2N/P4N, P1N/P2N/P3N, P1N/P2N/P4N, P1N/P3N/P4N, P2N/P3N/P4N. Ιδιαίτερα προτιμάται σετ ολιγονουκλεϊτιδίων που περιλαμβάνει και τα τέσσερα ολιγονουκλεϊτίδια εκκινητές, δηλαδή τα P1N/P2N/P3N/P4N.

Αυτοί οι εκκινητές στοχεύουν στην γενωμική περιοχή του ειδικού για το MAP στοιχείου IS900 και δίνουν τη δυνατότητα της αποτελεσματικής, γρήγορης και αξιόπιστης ανίχνευσης του *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Αυτοί οι εκκινητές επελέχθησαν ανάμεσα σε περισσότερους ως έχοντες καλλίτερα αποτελέσματα.

#### Λεπτομερής περιγραφή

Η χρήση των ανωτέρω αναφερομένων ολιγονουκλεϊτιδίων-εκκινητών μόνων τους ή σε συνδυασμό βρέθηκε ότι είναι προτιμώτερη σε μία αντίδραση ένθετης PCR ενός φιαλιδίου (one-tube nested PCR) για την αποτελεσματική ανίχνευση του MAP. Σε μία προτιμώμενη εφαρμογή χρησιμοποιούνται συνδυασμοί ολιγονουκλεϊτιδίων εκκινητών ώστε να σχηματίζονται σετ ολιγονουκλεϊτιδίων. Τα σετ ολιγονουκλεϊτιδίων τα οποία είναι χρήσιμα για την ταυτοποίηση του MAP είναι τα P1N/P2N, P3N/P4N, P1N/P3N, P1N/P4N, P2N/P3N, P2N/P4N, P1N/P2N/P3N, P1N/P2N/P4N, P1N/P3N/P4N, P2N/P3N/P4N. Σε άλλη ιδιαίτερα προτιμώμενη εφαρμογή είναι το σετ ολιγονουκλεϊτιδίων να περιέχει και τα τέσσερα ολιγονουκλεϊτίδια εκκινητές και δη τα P1N/P2N/P3N/P4N. Περαιτέρω προτιμάται η χρήση αντίδραση ένθετης PCR ενός φιαλιδίου (one-tube nested PCR) η οποία χρησιμοποιεί και τα τέσσερα ολιγονουκλεϊτίδια εκκινητές.

Για να επιτύχουμε μέθοδο για την αξιόπιστη ανίχνευση και ταυτοποίηση του MAP μέσω PCR, έγιναν εξετάσεις σε διάφορα εργαστήρια, κάποια από τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικές χώρες. Για να εξακριβώσουμε την ακρίβεια της μεθόδου, όλες οι διαφορετικές παράμετροι οι οποίες κανονικά συνθέτουν μια αντίδραση PCR δεν εναρμονίσθηκαν και το στοιχείο αυτό ελήφθη επίσης υπ' όψη για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου μας.

Η ανωτέρω προσέγγιση δεν έχει ποτέ μέχρι τώρα περιγραφεί αναφορικά με το MAP.

Διαφορετικά εργαστήρια ανέλαβαν να αξιολογήσουν τις διαδικασίες απομόνωσης DNA και τις διάφορες αντιδράσεις PCR, για την ανίχνευση του MAP. Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκαν μία μέθοδος που εξελίξαμε εμείς (in-house) και μια μέθοδος του εμπορίου, ενώ για την PCR εκτιμήθηκε σημαντικός αριθμός διαφορετικών αντιδράσεων, αρχής γενομένης με την εκτίμηση της ειδικότητας των εκκινητών με εκτεταμένη έρευνα της βάσεως-δεδομένων GenBank.

Έτσι καταλήξαμε σε μία αντίδραση ένθετης PCR που διεξάγεται εντός ενός φιαλιδίου (one tube nested PCR), σε δύο αντιδράσεις ένθετης (nested) PCR και σε μία

απλή αντίδραση PCR που στοχεύουν διαφορετικές γενωμικές περιοχές του ειδικού για το MAP στοιχείου IS900. Αυτές οι τέσσερις μέθοδοι εφαρμόστηκαν σε θετικά και αρνητικά δείγματα μάρτυρες, που ήταν γνήσιες βακτηριακές καλλιέργειες και ιστών μονιμοποιημένων σε παραφίνη (ΙΜΠΙ) το οποίο απομονώθηκε από βοοειδή με παραφυματίωση και όρνιθες με επιμολύνσεις *Mycobacterium avium*. Στις εξετάσεις που έγιναν όλα τα δείγματα σημειώθηκαν με κωδικούς αριθμούς και τα αποτελέσματα κοινοποιήθηκαν ανάμεσα στα συνεργαζόμενα εργαστήρια. Με βάση το κριτήριο της αξιοπιστίας και του κόστους, η διαδικασία η οποία είχε τα καλύτερα αποτελέσματα ήταν η αντίδραση ένθετης PCR που διεξάγεται εντός ενός φιαλιδίου (one tube nested PCR) η οποία χρησιμοποιεί τα ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές που αναφέραμε παραπάνω σε συνδυασμό με την μέθοδο απομόνωσης DNA που αναπτύξαμε. Η μέθοδος αυτή παρήγαγε το αναμενόμενο αποτέλεσμα από τα θετικά και αρνητικά δείγματα – μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν, επιτρέποντάς διαφοροποίηση ακόμη και ανάμεσα σε γενετικά συγγενή είδη μυκοβακτηριδίων. Η συμφωνία των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν από τα διαφορετικά εργαστήρια όπου έλαβαν χώρα οι εξετάσεις δείχνει την αξιοπιστία της προτεινόμενης αντίδρασης, ακόμη και κάτω από διαφορετικές εργαστηριακές συνθήκες.

### Παραδείγματα

Υλικά:

Οι μοριακές τεχνικές που αναπτύχθηκαν και που περιγράφονται κατωτέρω εφαρμόστηκαν δοκιμαστικά σε DNA που απομονώθηκε από καλλιέργειες και κλινικά υλικά (δείγματα ιστών μονιμοποιημένων σε παραφίνη (ΙΜΠΙ)).

Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες του *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (10 στελέχη) καθώς και διαφόρων άλλων ειδών του *Mycobacterium* spp., (30 στελέχη) (Πίνακας 1). Για τον έλεγχο της ειδικότητας της προτεινόμενης μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν, εκτός των παραπάνω, και καλλιέργειες διαφόρων συγγενικών προς το *Mycobacterium* spp., βακτηριακά είδη (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp.).

Τα κλινικά υλικά (δείγματα ιστών) που εξετάστηκαν αφορούσαν βιοψίες εντέρου βοοειδών με ιστολογικές αλλοιώσεις παραφυματίωσης (10 δείγματα) καθώς και παρόμοιο υλικό από διάφορα όργανα (συκώτι και έντερα) ορνίθων (10 δείγματα). Οι καλλιέργειες των υλικών αυτών απέδειξαν την παρουσία MAP στα δείγματα των βοοειδών και *Mycobacterium avium* στα δείγματα των πτηνών. Τέλος εξετάστηκαν και βιοπτικά υλικά εντέρου (30 δείγματα) φρέσκα και ΙΜΠΙ που προέρχονταν από ανθρώπους και ζώα χωρίς

καμία ένδειξη μυκοβακτηριακής λοίμωξης, κλινικής ή άλλης. Τα υλικά αυτά χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες (τα δεδομένα αυτά δεν συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα περιγραφή).

## 5 Μέθοδοι:

### A) Απομόνωση DNA από δείγματα IMPI και βακτηριακές καλλιέργειες.

Αναφορικά στα μονιμοποιημένα σε παραφίνη βιοπτικά υλικά (IMPI), αξιολογήθηκαν δύο μέθοδοι απομόνωσης DNA που εφαρμόστηκαν αμφότερες σε 2-3 τομές παραφίνης πάχους 10μm ανά δείγμα.

- 10 A1. Η μέθοδος (in-house) που έχει περιγραφεί προηγουμένως (Ikonomopoulos et al., 1999), περιλαμβάνει αρχικά την αποπαραφίνωση του υλικού, η οποία επιτυγχάνεται με διαδοχικές εμβαπτίσεις του, σε ξυλόλη θερμοκρασίας 60°C, αιθανόλη 100% και τέλος αιθανόλη 75%. Για την απομόνωση του DNA, το προϊόν της παραπάνω διαδικασίας εμβαπτίζεται για περίπου μία ώρα, σε SDS και πρωτεϊνάση K θερμοκρασίας 50°C, ώστε να
- 15 επιτευχθεί η ενζυμική αποδόμηση κυτταρικών πρωτεϊνών.

Η απομάκρυνση των πρωτεϊνών αυτών, γίνεται με την προσθήκη διαδοχικά, φαινόλης και διαλύματος φαινόλης – χλωροφορμίου – ισοαμυλικής αλκοόλης. Ακολούθως το DNA καταβυθίζεται με την προσθήκη αιθανόλης και οξικού νατρίου (Sambrook et al., 1989) και συλλέγεται με τη μορφή ιζήματος που αραιώνεται σε 50μl ρυθμιστικού διαλύματος TE.

- 20 A2. Εναλλακτικά η απομόνωση του DNA από δείγματα IMPI έγινε και με την τυποποιημένη διαδικασία MicroLysis (Microzone) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Η απομόνωση DNA από βακτήρια έγινε αρχικά με CTAB-πρωτεϊνάσης K και ακολούθως, με συνδυασμό φαινόλης και διαλύματος φαινόλης – χλωροφορμίου – ισοαμυλικής

25 αλκοόλης. Τέλος το προϊόν DNA καταβυθίζεται με την προσθήκη αιθανόλης και οξικού νατρίου όπως περιγράφεται παραπάνω.

Η εκτίμηση της ποιότητας του παραγόμενου DNA αναφορικά στην ποσότητα και την ακεραιότητα του, έγινε, αντίστοιχα, με μετρήσεις οπτικής απορρόφησης και ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης.

30

### B) Η Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR):

Εξετάσθηκε ένας σημαντικός αριθμός αντιδράσεων PCR, αρχής γενομένης με την εκτίμηση της ειδικότητας των εκκινητών αναφορικά στη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία με εκτεταμένες έρευνες με τη χρήση της δικτυακής μηχανής αναζήτησης NCBI BLAST



στην βάση δεδομένων Genbank. Έτσι, αναπτύχθηκαν και αξιολογήθηκαν τέσσερις μέθοδοι PCR που περιλαμβάνουν συνολικά επτά ζεύγη ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών οι οποίοι στοχεύουν σε διαφορετικές γενωμικές περιοχές του ειδικού για το MAP στοιχείου IS900.

B1. Η πρώτη αντίδραση PCR έγινε με το ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών IS900-F και IS900-R (πίνακας 2). Οι εκκινητές αυτοί επικολλούνται επί της γενωμικής περιοχής IS900 του MAP και αντιγράφουν μία νουκλεοτιδική αλληλουχία μεγέθους 707 ζευγών βάσεων (ζβ) DNA (Green et al 1989).

B2. Μια άλλη αντίδραση ένθετης (nested) PCR ήταν αντίδραση που περιλαμβάνει αρχικά την αντιγραφή μίας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεγέθους 563 ζβ της γενωμικής περιοχής IS900 του MAP, με τη χρήση των ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών s204 και s749 (πίνακας 2). Το προϊόν αυτής της αντίδρασης, αραιωμένο 1:10, χρησιμοποιείται σε μία δεύτερη αντίδραση PCR με το ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών s345 και s535 (πίνακας 2) για να γίνει η αντιγραφή μίας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεγέθους 210 ζβ που εμπεριέχεται στη γενωμική περιοχή των 563 ζβ που αντιγράφεται κατά την προηγούμενη αντίδραση (Englund et al 1999).

B3. Μια άλλη αντίδραση ένθετης (nested) PCR ήταν αντίδραση που περιλαμβάνει αρχικά την αντιγραφή μίας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεγέθους 302 ζβ της γενωμικής περιοχής IS900 του MAP, με τη χρήση των ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών IS01 και IS04 (πίνακας 2). Το προϊόν αυτής της αντίδρασης, αραιωμένο 1:10, χρησιμοποιείται σε μία δεύτερη αντίδραση PCR με το ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών IS02 και IS03 (πίνακας 2) για να γίνει η αντιγραφή μίας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεγέθους 159 ζβ που εμπεριέχεται στη γενωμική περιοχή των 302 ζβ που αντιγράφεται κατά την προηγούμενη αντίδραση.

B4. Τέλος, μια άλλη αντίδραση ένθετης PCR ήταν αντίδραση που διεξάγεται εντός ενός φιαλιδίου (one tube nested PCR) και περιλαμβάνει τα ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές P1N, P2N, P3N και P4N (πίνακας 2), τα οποία τοποθετούνται ταυτόχρονα στο μίγμα της αντίδρασης και αντιγράφουν τελικά μία νουκλεοτιδική αλληλουχία μεγέθους 257 ζβ της γενωμικής περιοχής IS900.

Το μίγμα των αντιδράσεων PCR που αναφέρθηκαν παραπάνω, συνιστούνταν από 50 mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8,4 σε θερμοκρασία δωματίου), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25μM

από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο-εκκινητή, 200μM dNTPs, 2.5 units Taq πολυμεράσης (Promega), 0.05-0.1 μg DNA, και νερό ποιότητας υγρής χρωματογραφίας (HPLC) μέχρι τελικού όγκου 50 μl για τις μεθόδους B1, B4 και 25 μl για τις μεθόδους B2, B3.

Οι συνθήκες επώασης που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις B1-B3, περιλαμβάνουν τον ακόλουθο συνδυασμό που επαναλαμβάνεται συνολικά 40 φορές: 1 λεπτό στη θερμοκρασία των 94°C, 1 λεπτό στη θερμοκρασία των 63°C (αντιδράσεις B1, B2) ή 62°C (αντίδραση B3), και τέλος 1 λεπτό στη θερμοκρασία των 72°C. Πριν από αυτό το στάδιο, γίνεται επώαση του μίγματος της αντίδρασης PCR στη θερμοκρασία των 94°C για 5 λεπτά ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη του DNA, ενώ μετά την ολοκλήρωση του, ακολουθεί επώαση στη θερμοκρασία των 72°C για 10 λεπτά, ώστε να ολοκληρωθεί η σύνθεση του παραγόμενου DNA. Τα δύο αυτά στάδια επώασης χρησιμοποιούνται με τον ίδιο τρόπο και για τη μέθοδο B4 που περιλαμβάνει δύο διαδοχικούς συνδυασμούς επώασεων οι οποίες επαναλαμβάνονται 16 και 30 φορές αντίστοιχα. Ο αρχικός συνδυασμός περιλαμβάνει επώαση του μίγματος της αντίδρασης για 1 λεπτό στη θερμοκρασία των 94°C, 45 δευτερόλεπτα στη θερμοκρασία των 54°C, και τέλος 3 λεπτά στη θερμοκρασία των 72°C. Ο ακόλουθος συνδυασμός περιλαμβάνει επώαση του προϊόντος της προηγούμενης αντίδρασης για 1 λεπτό στη θερμοκρασία των 94°C, 45 δευτερόλεπτα στη θερμοκρασία των 64°C, και τέλος 2 λεπτά στη θερμοκρασία των 72°C. Για όλες τις αντιδράσεις PCR που προαναφέρθηκαν, χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής MJ (MJ Inc., Watertown, MA, USA), ενώ το προϊόν αυτών των αντιδράσεων ηλεκτροφορείται σε πηκτή αгарόζης που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο 2% και φωτογραφίζεται με διάταξη Polaroid, σε οθόνη εκπομπής υπεριώδους φωτός.

Ο προσδιορισμός της ευαισθησίας των παραπάνω μεθόδων έγινε όπως έχει περιγραφεί ήδη (Ikonomopoulos et al., 1998) με τη δοκιμαστική εφαρμογή τους σε δεκαδικές αραιώσεις DNA από MAP.

Εκτίμηση της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων:

Οι παραπάνω μέθοδοι απομόνωσης DNA και PCR, εφαρμόστηκαν στο υλικό αναφοράς και στα κλινικά υλικά που περιγράφονται ανωτέρω, υπό τις διαφορετικές ειδικότερες συνθήκες κάθε διαφορετικού εργαστηρίου (τύπος θερμικού κυκλοποιητή, τύπος DNA πολυμεράσης, τρόπος προετοιμασίας των αντιδράσεων buffers). Τα δείγματα έλαβαν κωδικούς αριθμούς και τα αποτελέσματα κοινοποιήθηκαν μεταξύ των διαφόρων εργαστηρίων και συγκρίθηκαν.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### A. Απομόνωση DNA:

Για τα δείγματα ΙΜΠ, διαπιστώθηκε ότι τόσο η ενζυμική μέθοδος (in-house) που βασίζεται στο συνδυασμό φαινόλης-χλωροφορμίου-ισοαμυλικής αλκοόλης, όσο και η τυποποιημένη διαδικασία Microlysis, επιτρέπουν την απομόνωση DNA ικανοποιητικής ποιότητας και ποσότητας. Το προϊόν DNA που προκύπτει από 2-3 τομές παραφίνης πάχους 10μm, προσδιορίστηκε περίπου στο 1μg/μl και παρουσιάζει την ίδια ουσιαστικά ποιότητα, αναφορικά στην ακεραιότητα του προϊόντος, ανεξαρτήτως της μεθόδου που χρησιμοποιείται. Παρόλα αυτά διαπιστώθηκε διαφορά κόστους μεταξύ των παραπάνω μεθόδων, με την ενζυμική μέθοδο να πλεονεκτεί σημαντικά.

Για την απομόνωση DNA από βακτήρια απομονωμένα σε καλλιέργειες, φαίνεται, όπως ήταν αναμενόμενο, ότι η ενζυμική μέθοδος έδωσε πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα αναφορικά στην ποσότητα και την ακεραιότητα του παραγόμενου προϊόντος.

### B. PCR:

Η εφαρμογή των παραπάνω τεσσάρων αντιδράσεων PCR (B1, B2, B3 και B4) σε απομονωμένα βακτήρια, επέτρεψε, με απόλυτη ειδικότητα, την ανάδειξη και ταυτοποίηση όλων των στελεχών MAP που χρησιμοποιήθηκαν (πίνακας 1). Αντίθετα κανένας από τους αρνητικούς μάρτυρες, τόσο αναφορικά στα δείγματα ΙΜΠ, όσο και στα απομονωμένα βακτήρια, δεν αντέδρασε θετικά με οποιαδήποτε από τα αντίστοιχα ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές. Ο αριθμός των θετικών αποτελεσμάτων που καταγράφηκαν από το σύνολο των δέκα διαθέσιμων δειγμάτων ΙΜΠ βοοειδών με παραφυματίωση, όπως προέκυψαν από την εφαρμογή των μεθόδων B1, B2, B3 και B4, ήταν αντίστοιχα 6, 10, 6 και 10 (πίνακας 4) (Σχέδιο 1).

Η ευαισθησία των μεθόδων PCR που αξιολογήθηκαν κυμάνθηκε σε πολύ ικανοποιητικά επίπεδα ιδιαίτερα για με τις μεθόδους ένθετων PCR. Η ελάχιστη ποσότητα DNA που ανιχνεύθηκε από απομονωμένα βακτήρια ήταν 8 pg που αντιστοιχεί περίπου σε 1500 βακτηριακά κύτταρα (Baess et al., 1984).

### Γ. Εκτίμηση της επαναληψιμότητας:

Απόλυτα συνεπή αποτελέσματα σχετικά με την ικανότητα των αντιδράσεων B1 έως B4 να ανιχνεύουν το σύνολο των στελεχών MAP από καλλιέργειες και βιοπτικό υλικό (ΙΜΠ) κατεγράφησαν και σε όλα στα συνεργαζόμενα εργαστήρια.

Πιο συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι οι αντιδράσεις B2 και B3 είναι δυνατό μόνο σε συνδυασμό να καλύψουν διαγνωστικά όλο το εύρος των στελεχών *MAP*, ενώ η ίδια ανεπάρκεια διαπιστώθηκε και για την αντίδραση B1. Η αντίδραση B4 επέτρεψε την ανίχνευση όλων των στελεχών *MAP*, ανεξαρτήτως του υλικού που χρησιμοποιήθηκε.

5 Βάσει των πειραματικών μας δεδομένων προκύπτει ότι η μέθοδος που συνδυάζει την υψηλότερη ευαισθησία, ειδικότητα και επαναληψιμότητα, εξασφαλίζοντας άμεση δυνατότητα επαλήθευσης των αποτελεσμάτων στον μικρότερο δυνατό χρόνο και με το μικρότερο σχετικά κόστος, είναι η αντίδραση B4, ένθετης PCR που διεξάγεται εντός ενός φιαλιδίου (one-tube nested PCR). Πιο συγκεκριμένα διαπιστώθηκε ότι οι μέθοδοι B1 και  
10 B4, ανίχνευσαν με ειδικότητα όλα τα στελέχη *MAP*, ανάμεσα στα βακτήρια που βρίσκονταν απομονωμένα σε καλλιέργειες, ενώ μόνο οι μέθοδοι B2 και B4 ανίχνευσαν το σύνολο των θετικών δειγμάτων ΙΜΠ που χρησιμοποιήθηκαν, παρά το γεγονός ότι όλοι οι εκκινητές σχεδιάστηκαν για να ανιχνεύουν το σύνολο των στελεχών *MAP* και η σύνθεσή τους προσδιορίστηκε βάση της ίδιας γενωμικής περιοχής (IS900). Το γεγονός αυτό  
15 προσδιορίζει και μία άλλη παράμετρο της σημασίας της παρούσας εφεύρεσης και καταδεικνύει τη σκοπιμότητα της πειραματικής προσέγγισης που ακολουθήθηκε, δεδομένης της αναγκαιότητας της αποφυγής ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, ιδίως στην περίπτωση που η μέθοδος χρησιμοποιείται όχι ερευνητικά αλλά διαγνωστικά.

Η ανεπάρκεια των μεθόδων B1 και B3 θα πρέπει να αποδοθεί πιθανώς στη  
20 μικρότερη ευαισθησία τους, γεγονός αναμενόμενο ιδίως για την μέθοδο B1, ή στη γενετική ποικιλότητα των στελεχών *MAP*, αναφορικά τουλάχιστον στα δείγματα ΙΜΠ που χρησιμοποιήθηκαν. Η παρουσία αναστολέων της PCR που συχνά αποτελεί αιτία ψευδώς αρνητικών αντιδράσεων (Hermon-Taylor et al., 2000), ιδίως για τέτοιου είδους δείγματα, δεν θα μπορούσε να αποτελεί την αιτία αυτής της ασυμφωνίας, δεδομένου ότι το ίδιο  
25 προϊόν DNA χρησιμοποιήθηκε και για τις αντιδράσεις B2 και B4. Για τον ίδιο λόγο, αιτία των παραπάνω δεν μπορεί να θεωρηθεί ούτε ο πιθανός κατακερματισμός του χρησιμοποιούμενου DNA, που ελέγχονταν άλλωστε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης, αλλά ούτε και η επιλογή της γενωμικής αλληλουχίας IS900, ως κοινό στόχο των αντιδράσεων που χρησιμοποιήθηκαν. Η επιλογή αυτή θα πρέπει ίσως να θεωρηθεί και  
30 αναπόφευκτη, δεδομένου ότι η μοριακή ανίχνευση του *MAP* βασίζεται σήμερα σχεδόν κατά αποκλειστικότητα στην αλληλουχία IS900, στο βαθμό μάλιστα που η ανάδειξή της να αποτελεί προϋπόθεση ταυτοποίησης του συγκεκριμένου είδους (Green et al., 1998).

Η αντίδραση B4 εμφανίζει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σύγκριση και με την αντίδραση B2 ανεξαρτήτως της επιβεβαιωμένης διαγνωστικής επάρκειας αμφοτέρων. Πιο



συγκεκριμένα, η αντίδραση B2 αποτελεί μία μέθοδο ένθετης PCR που διεξάγεται σε δύο διαδοχικά στάδια. Η μετάβαση από το ένα στάδιο στο άλλο, απαιτεί τη διάνοιξη του φιαλιδίου που χρησιμοποιείται για το πρώτο μέρος της αντίδρασης, γεγονός που εγκυμονεί σοβαρούς κινδύνους επιμόλυνσης, εξαιτίας της υψηλής πιθανότητας εισαγωγής στο μίγμα της τελικής αντίδρασης, προϊόντων DNA προηγούμενων θετικών αντιδράσεων που αφθονούν στο χώρο του εργαστηρίου (carry-over effect). Αντίθετα, το γεγονός αυτό, που οδηγεί συχνά σε αύξηση του ποσοστού των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα της αντίδρασης B4, δεδομένου ότι το μίγμα αυτής της αντίδρασης τοποθετείται στο ειδικό φιαλίδιο εξαρχής και δεν διανοίγεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Εκτός όμως αυτού, η αντίδραση B4 πλεονεκτεί ως προς την αντίδραση B2, αλλά και ως προς την αντίδραση B3, γιατί απαιτεί σημαντικά λιγότερο χρόνο ενώ και το κόστος της είναι μικρότερο.

Τα παραπάνω πλεονεκτήματα της αντίδρασης B4 και το γεγονός ότι επιτρέπει, όπως άλλωστε και οι άλλες αντιδράσεις ένθετης PCR που προαναφέρθηκαν, την επαλήθευση του αποτελέσματος χωρίς την ανάγκη χρησιμοποίησης εσωτερικού μάρτυρα, που αυξάνει σημαντικά το κόστος και την πολυπλοκότητα της αντίδρασης, αλλά χωρίς και την ανάγκη DNA υβριδισμού, που αυξάνει εκτός των άλλων και τη χρονική διάρκεια της διαγνωστικής διαδικασίας, την καθιστούν σαφώς επικρατέστερη μεταξύ των μεθόδων που μελετήθηκαν.

Εκτός των παραπάνω, η αντίδραση B4 επέδειξε ιδιαίτερα υψηλή ευαισθησία, κάτι που διασφαλίζει την ελαχιστοποίηση του ποσοστού των ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων. Το γεγονός άλλωστε ότι η προτεινόμενη αντίδραση ανίχνευσε αποκλειστικά και μόνο τα στελέχη *MAP* από όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν, καταδεικνύει την πολύ υψηλή της ειδικότητα, που διασφαλίζει και την ελαχιστοποίηση του ποσοστού των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Αναφορικά στο τελευταίο είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η συγκεκριμένη αντίδραση επέδειξε απόλυτη ειδικότητα όχι μόνο με τα βακτήρια που ήταν απομονωμένα σε καλλιέργεια, αλλά και με τα δείγματα ΙΜΠΙ που προέρχονταν από όρνιθες με λοίμωξη από *Mycobacterium avium*, το οποίο παρουσιάζει ιδιαίτερα υψηλή γενετική συγγένεια με το *MAP*. Το γεγονός άλλωστε, ότι με την αντίδραση B4 κατεγράφησαν τα ίδια ικανοποιητικά αποτελέσματα και στα πλαίσια της προαναφερθείσας διεργαστηριακής συνεργασίας, ενισχύει την αξιοπιστία της και υποστηρίζει τα παραπάνω δεδομένα.

Συμπερασματικά μπορεί να υποστηριχτεί ότι η αντίδραση ένθετης PCR B4 χαρακτηρίζεται από ταχύτητα και χαμηλό σχετικά κόστος ενώ επιτρέπει με πολύ υψηλή

ευαισθησία, ειδικότητα και αξιοπιστία, την ανίχνευση του *MAP* από ιστούς μονιμοποιημένους σε παραφίνη. Αυτό απεδείχθη όχι μόνον με της βακτηριακές καλλιέργειες αλλά και με τα ελεύθερα *MAP* δείγματα *IMPI* που προέρχονταν από κοτόπουλα, παρά την υψηλή γενετική ομοιότητα του τελευταίου με το *MAP*. Τέλος, η

5 συνέπεια των αποτελεσμάτων της συγκεκριμένης μεθόδου που ελήφθη από τα συνεργαζόμενα εργαστήρια καθιστά την αντίδραση B4 μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο για την αξιόπιστη διάγνωση ρουτίνας του *MAP*.

Λαμβανομένης υπ' όψιν της τεχνικής βάσης μιας αντίδρασης PCR, η προτεινόμενη μέθοδος με τα συγκεκριμένα ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές μπορεί να παράγει

10 αποτελέσματα ίσης αξίας (ευαισθησίας – εξειδίκευσης) με δείγματα άλλα πέραν από κλινικά δείγματα, εφόσον η διαδικασία απομόνωσης του DNA παράγει DNA όμοιας αξίας όπως αυτά που αναφέρουμε ανωτέρω. Η εξαιρετική απόδοση της προτεινόμενης αντίδρασης με τα συγκεκριμένα ολιγονουκλεοτίδια εκκινητές επιβεβαιώθηκε με την ανίχνευση *MAP* σε δείγματα τυριού και γάλακτος τα οποία συνελλέχθησαν από την

15 Ελλάδα και την Δημοκρατία της Τσεχίας και εκτιμήθηκαν με διαφορετικές αντιδράσεις PCR και με καλλιέργεια.

#### **Λεπτομερής περιγραφή των Σχεδίων και των Πινάκων**

Ο Πίνακας 1 δείχνει τα πρότυπων στελέχη μυκοβακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην

20 αξιολόγηση των προτεινόμενων μεθόδων PCR.

Ο Πίνακας 2 δείχνει την σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Ο Πίνακας 3 δείχνει τις θερμοκρασίες των αντιδράσεων PCR B1, B2, B3 και B4.

Ο Πίνακας 4 δείχνει την συγκριτική παρουσίαση αποτελεσμάτων PCR σε δείγματα *IMPI*

25 βοοειδών με παραφυματίωση (st. Johns disease).

Το Σχέδιο 1 δείχνει αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης προϊόντων DNA βιοπτικών υλικών βοοειδών και πτηνών που εξετάστηκαν με τις αντιδράσεις B1, B2, B3 και B4.

30 Ειδικότερα,

Η Σειρά 1 δείχνει 100ζβ (Biolabs) DNA δείκτης.

Η Σειρά 2-4 δείχνει προϊόντα αντιδράσεων PCR σε δείγματα λεπτού εντέρου βοοειδών.

Η Σειρά 5 δείχνει προϊόν αντίδρασης PCR σε δείγμα μεσεντέριου λεμφαδένα βοοειδούς.

Η Σειρά 6-7 δείχνει προϊόν αντίδρασης PCR σε δείγματα ειλεού βοοειδών.



Η Σειρά 8 δείχνει προϊόν αντίδρασης PCR σε δείγμα σπληνός όρνιθας.

Η Σειρά 9 δείχνει προϊόν αντίδρασης PCR σε δείγμα ήπατος όρνιθας .

Η Σειρά T δείχνει προϊόν αντίδρασης PCR σε αρνητικός μάρτυρας χωρίς DNA.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Baess I. Determination and re-examination of genome sizes and base ratios on deoxyribonucleic acid from mycobacteria. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect B* 1984; B92:209-211.
- Chamberlin W, Graham DY, Hulten K, El-Zimaity HM, Schwartz Naser, S, Shafran I, El-Zaatari FA. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* one cause of Crohn's disease, *Aliment Pharmacol Ther* 2001, 15:337-346.
- Chiodini RJ. Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clin Microbiol Rev.* 1989 Jan;2(1):90-117. Review.
- Englund S, Ballagi-Pordany A, Bolske G and Johansson KE (1999) Single PCR and nested PCR with a *mmic* molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 33, 163-171.
- Gazouli M, Ikonomopoulos JA, Zacharatos P et al. Incidence of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in soft cheese in Greece. Proceedings of the 8<sup>th</sup> international conference on environmental science and technology, Lemnos, Greece, 2003 A pp 240-244.
- Hance AJ, Grandchamp B, Levy-Frebault V, Iecossier D, Rauzier J, Bocart D, Giquel B. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol. Microbiol.* 1989, 3:843-849.
- Hermon-Taylor J, Bull TJ, Sheridan J, Cheng J, Stellakis ML, Sumar N. Causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*. *Can J Gastroenterol* 2000, 14:521-539.
- Ikonomopoulos JA., Gorgoulis VG, Zacharatos PV., et al. Multiplex PCR assay for the detection of mycobacterial DNA directly from sputum. *In Vivo* 1998;12:547-552.
- Ikonomopoulos JA., Gorgoulis VG, Zacharatos PV., et al. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of mycobacterial DNA in cases of tuberculosis and sarcoidosis. *Mod Pathol* 1999;12:854-862.
- Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis V. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of the traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Veterinary Parasitol* 2003; 113/2:99-113.
- Green EP, Tizard MLV, Moss MT, Thompson J, Winterbourn DL, McFadden JJ and Hermon-Taylor J (1989) Sequence and characteristics of IS900, an insertion element

identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. Nucl. Ac Res 17, 9063-9073.

- Nielsen SS, Houe H, Thamsborg SM, Bitsch V. Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle using different subspecies strains of *Mycobacterium avium*. J Vet Diagn Invest. 2001 Mar;13(2):164-6.
- Ridge SE, Morgan IR, Sockett DC, Collins MT, Condrón RJ, Skilbeck NW, Webber JJ. Comparison of the Johne's absorbed EIA and the complement-fixation test for the diagnosis of Johne's disease in cattle. Aust Vet J. 1991 Aug;68(8):253-7. Erratum in: Aust Vet J 1991 Dec;68(12):399.
- Sambrook J., Fritsche E.F., Maniatis T. Molecular Cloning , A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press 1989 2<sup>nd</sup> Edition

Πίνακας 1:

Στελέχη πρότυπων μυκοβακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στην αξιολόγηση των μεθόδων

5

| Αριθμός | Είδος                            | Προέλευση                       |
|---------|----------------------------------|---------------------------------|
| 1       | <i>M. tuberculosis</i>           | RIMV, Ολλανδία                  |
| 1       | <i>M. canneti</i>                |                                 |
| 1       | <i>M. bovis BCG</i>              |                                 |
| 5       | <i>M. anium</i>                  |                                 |
| 1       | <i>M. intracellulare type I</i>  |                                 |
| 1       | <i>M. intracellulare type II</i> |                                 |
| 1       | <i>M. gordonae I</i>             |                                 |
| 1       | <i>M. fortuitum</i>              |                                 |
| 1       | <i>M. scrofulaceum</i>           |                                 |
| 1       | <i>M. kansasii</i>               |                                 |
| 1       | <i>M. paratuberculosis</i>       |                                 |
| 8       | <i>M. tuberculosis</i>           | Νοσοκομείο Νοσημάτων<br>Θώρακος |
| 3       | <i>M. avium</i>                  |                                 |
| 3       | <i>M. gordonae</i>               |                                 |
| 1       | <i>M. celatum</i>                |                                 |
| 1       | <i>M. fortuitum</i>              | VRI, Δημοκρατία της<br>Τσεχίας  |
| 9       | <i>M. paratuberculosis</i>       |                                 |



## Πίνακας 2:

Σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδίων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

5

| Αντίδραση<br>PCR | Κωδική ονομασία<br>ολιγονουκλεοτιδίου<br>εκκινητή | Σύνθεση ολιγονουκλεοτιδίου εκκινητή |
|------------------|---|-------------------------------------|
| B1               | IS900-F   | ACGCCGCGGGTAGTTA                    |
|                  | IS900-R   | GGGGCGTTTGAGGTTTC                   |
| B2               | s204  | TGATCTGGACAATGACGGTTACGGA           |
|                  | s749  | CGCGGCACGGCTCTTGTT                  |
|                  | s345  | GCCGCGCTGCTGGAGTTGA                 |
|                  | s535  | AGCGTCTTTGGCGTCGGTCTTG              |
| B3               | IS01  | CTTACCTTTCTTGAAGGGTGTTTC            |
|                  | IS04  | GTCGTTAATAACCATGCAGTAATG            |
|                  | IS02  | GTATGGCTTTTCATGTGGTTGCT             |
|                  | IS03  | TAACCGTCATTGTCCAGATCAAC             |
| B4               | P1N   | CGAATGACCGATGGTTTGAG                |
|                  | P2N   | CTAAGAGTTACTGCAACAGT                |
|                  | P3N   | GGGTGTGGCGTTTTTCCTTCG               |
|                  | P4N   | TCCTGGGCGCTGAGTTCCTC                |

## Πίνακας 3:

Θερμοκρασίες των αντιδράσεων PCR B1, B2, B3 και B4.

| Temperature profile |                                |                       |                       |                        |                                |                       |                       |                        |
|---------------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| Reaction            | 1 <sup>st</sup> stage reaction |                       |                       |                        | 2 <sup>nd</sup> stage reaction |                       |                       |                        |
|                     | Dena/ratio<br>(°C/min)         | Annealing<br>(°C/min) | Extension<br>(°C/min) | Number<br>of<br>cycles | Dena/ratio<br>(°C/min)         | Annealing<br>(°C/min) | Extension<br>(°C/min) | Number<br>of<br>Cycles |
| <b>B1</b>           | 94/1                           | 63/1                  | 72/1                  | 60                     | -*                             | -*                    | -*                    | -*                     |
| <b>B2</b>           | 94/1                           | 63/1                  | 72/1                  | 35                     | 94/1                           | 63/1                  | 72/1                  | 35                     |
| <b>B3</b>           | 94/1                           | 62/1                  | 72/1                  | 35                     | 94/1                           | 62/1                  | 72/1                  | 35                     |
| <b>B4</b>           | 94/1                           | 54/1                  | 72/1                  | 16                     | 94/1                           | 67/1                  | 72/1                  | 30                     |

5 \* Reaction B1 is performed in a single stage





## Πίνακας 4:

Συγκριτική παρουσίαση αποτελεσμάτων PCR σε δείγματα ΙΜΠ βοοειδών με παραφυματίωση.

5

| Μέθοδος PCR         | Ποσοστό ανίχνευσης <i>MAP</i> |
|---------------------|-------------------------------|
| Απλή διαδικασία PCR | 6/10 (60%)                    |
| Nested-PCR (A)      | 10/10 (100%)                  |
| Nested-PCR (B)      | 6/10 (60%)                    |
| One tube nested PCR | 10/10 (100%)                  |

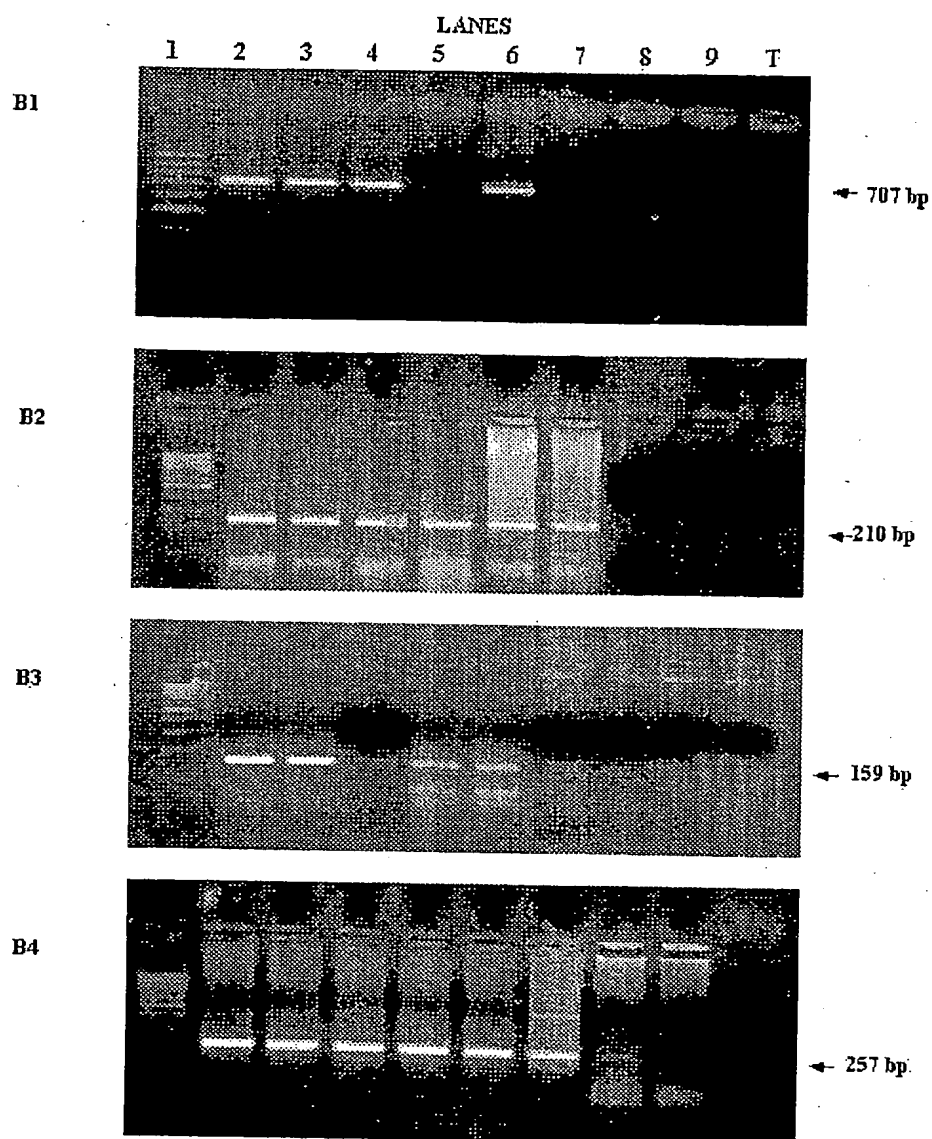


Figure 1



βοοειδή, όρνιθες ή πουλερικά και/ή σε δείγμα που προέρχεται από μη-ζωντανή προέλευση, ιδίως από σκόνη και από φυτά.

- 5 6. Χρήση της μεθόδου σύμφωνα με τις αξιώσεις 3 ή 4 για την διάγνωση μόλυνσης από MAP σε ζωντανό ον, συμπεριλαμβανομένου σε ανθρώπους, ιδίως δε σε βοοειδή, πουλερικά ή κοτόπουλα.
- 10 7. Συσκευασία (κιτ) που περιλαμβάνει ένα ή περισσότερα ολιγονουκλεοτίδια σύμφωνα με την αξίωση 1 και /ή ένα ή περισσότερα σετ ολιγονουκλεϊτιδίων σύμφωνα με την αξίωση 2 και ένα δοχείο.
8. Συσκευασία (κιτ) που περιλαμβάνει και τα τέσσερα ολιγονουκλεοτίδια σύμφωνα με την αξίωση 1 και ένα δοχείο.
- 15 9. Χρήση της συσκευασίας σύμφωνα με την αξίωση 7 ή 8 για τη μέθοδο σύμφωνα με την αξίωση 3 και/η 4.